



Birgül Özkesici,
Ayşe Akman Karakaş*

Otoimmün Büllöz Hastalıkların Serolojik Tanısı

Serological Diagnosis of Autoimmune Blistering Diseases

Öz

Otoimmün büllöz hastalıklar, epidermis veya dermoepidermal bileşenin yapısal proteinlerine karşı otoantikör gelişimi ve klinik olarak deri ve/veya mukozalarda bül ve erezyon oluşumu ile karakterize nadir görülen bir hastalık grubudur. Klinik özellikler bu grup hastalıklardan şüphelenmekte önemli yol gösterici bulgulardır. Tanı klinik özellikler, histopatolojik ve immünolojik bulgular bir arada değerlendirilerek konur. Bu grup hastalıklarda altın standart dokuda depolanmış ve/veya serumda dolaşan otoantikörlerin gösterilmesidir. Bu amaca yönelik metodlar; direkt ve indirekt immünofloresan, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), immünopresipitasyon ve immünoblottingdir. Bu yazının amacı otoimmün büllöz hastalıkların tanısında serolojik tanı yöntemlerinin yerini gözden geçirmek ve son dönemlerdeki gelişmeleri aktarmaktır.

Anahtar kelimeler: Otoimmün büllöz hastalıklar, tanı, immünofloresan bulgular, biyoçip, Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Abstract

Autoimmune blistering diseases are a rare diseases, characterized by development of autoantibodies against the structural proteins of the epidermis or dermoepidermal junction, and blisters and erosions on skin and/or mucous membranes clinically. Clinical features are important guiding findings for suspicious of this group of diseases. The diagnosis is achieved by the evaluation together of clinical features, histological and immunological findings. The gold standard in the diagnosis of this group diseases are demonstration of tissue bound and/or circulating autoantibodies. Methods for this purpose are; direct and indirect immunofluorescence, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), immunoprecipitation and immunoblotting. The aim of this paper is to review serological diagnostic methods in the diagnosis of autoimmune bullous diseases and to present developments in recent years.

Keywords: Autoimmune blistering diseases, diagnosis, immunofluorescence findings, biochip, Enzyme Linked Immunosorbent Assay

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Deri ve Zührevi Hastalıklar
Anabilim Dalı,
Malatya, Türkiye

*Akdeniz Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Deri ve Zührevi
Hastalıklar Anabilim Dalı,
Antalya, Türkiye

Yazışma Adresi/ Correspondence:

Birgül Özkesici,
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Deri ve Zührevi Hastalıklar
Anabilim Dalı, Malatya
E-posta: birgulozkesici@gmail.com
Geliş Tarihi/Submitted: 22.01.2016
Kabul Tarihi/Accepted: 05.02.2016

@Telif Hakkı 2016 Türk Dermatoloji
Derneği Makale metnine www.
turkdermatolojidergisi.com web
sayfasından ulaşılabilir.

@Copyright 2016 by Turkish Society
of Dermatology - Available on-line
at www.turkdermatolojidergisi.com

Giriş

Otoimmün büllöz hastalıklar (OBH), neden olabilecekleri morbidite ve mortalite göz önüne alındığında diğer deri hastalıkları arasında ayrı bir öneme ve yere sahiptirler. Bu hastalık grubunda tanı hastalardan alınan deri ve serum örneklerinde otoantikörlerin saptanmasına dayanmaktadır. Beutner ve Jordon (1), Beutner ve ark. (2) ve Jordon ve ark. (3) tarafından 1964'de pemfigus hastalarının serumlarında deri ve mukoz membrandaki interselüler antijenleri hedef alan antikörlerin ve hemen ardından büllöz pemfigoid (BP) otoantikörlerinin indirekt immünofloresan (İİF) yöntemler kullanılarak gösterilmesi OBH'nin tanısında ve etyopatogenezindeki

en önemli dönüm noktasıdır (1-3). OBH'nin çoğunda, özellikle pemfigusta, yan etki veya komplikasyon geliştirme riskleri oldukça yüksek ilaçlar veya tedavi yöntemleri kullanıldığından tedaviye başlamadan önce tanının spesifik otoantikörlerin gösterilerek doğrulanması önerilmektedir. Şekil 1'de Eming ve Hertl (4) tarafından önerilen tanısalla yaklaşım özetlenmiştir. Bu derlemede OBH'nin tanısında kullanılan serolojik tanı yöntemleri son dönemlerdeki gelişmeleri de kapsayacak şekilde sunulmaktadır.

İndirekt İmmünofloresan

İİF hasta serumundaki antikörlerin belirli antijenler kullanarak saptanması esasına dayanır, tanıyı doğrulamak ve/veya büllöz

hastalıklar arasında ayırıcı tanı yapmak amacıyla kullanılır. Serumda dolaşan otoantikörlerin varlığı bir ara doku (substrat) kullanılarak gösterilir. İİF'de seri dilüsyonları yapılmış serum örnekleri kullanılabilir. Hazırlanan preparatlar ultraviyole mikroskopu ile incelenir (Şekil 2). Tanıdaki değerinin yanında, bazı çalışmalarda İİF titrelerinin klinik hastalık aktivitesi ile direk ilişkili olduğu, hastalık takibinde ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde kullanılabilmesi öne sürülmüşse de son çalışmalar İİF titrelerinin klinik hastalık aktivitesini yansıtmada yetersiz olduğunu desteklemektedir (5). Bizim yaptığımız bir çalışmada ise İİF titreleri pemfigus hasta grubunda klinik aktivite ile uyumlu olsa da prediktif değerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (6).

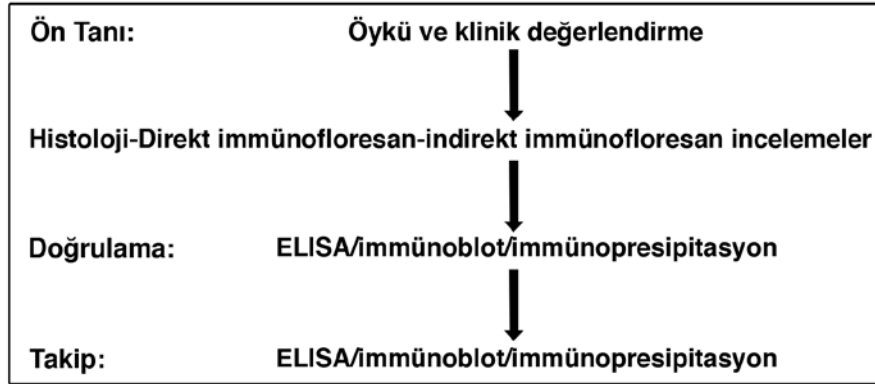
İİF'de farklı büllöz hastalıkların tanısında substrat olarak kullanılan antijenler insan derisi, maymun özofagusu, gine domuzu dudak ve özofagusu, sıçan mesanesi ve tuzda ayrıştırılmış insan derisidir (TAİD) (7). Substratların sensitivitesi ve spesifitesi farklı büllöz hastalıklarda değişiklik gösterir (7,8). Desmoglein 3'den (Dsg) zengin maymun özofagusu pemfigus vulgarisin (PV) IgG otoantikörlerini göstermede en sensitif substrattır (8). Dsg 1'den zengin gine domuzu özofagusu ise pemfigus foliaceus (PF) tanısında tercih edilen substrattır (9). Birden fazla substrat kullanımı ile tanısal sensitivite artırılabilir. İnsan derisi ve maymun özofagusu birlikte kullanıldığında tanısal sensitivite %100 iken, bu

substratlar tek tek kullanıldığında sensitivite sırasıyla %83 ve 90 olarak bildirilmiştir (1,10). Sensitivitesi en yüksek olanlar sırasıyla normal insan derisi, maymun özofagusu ve sıçan özofagusudur (11).

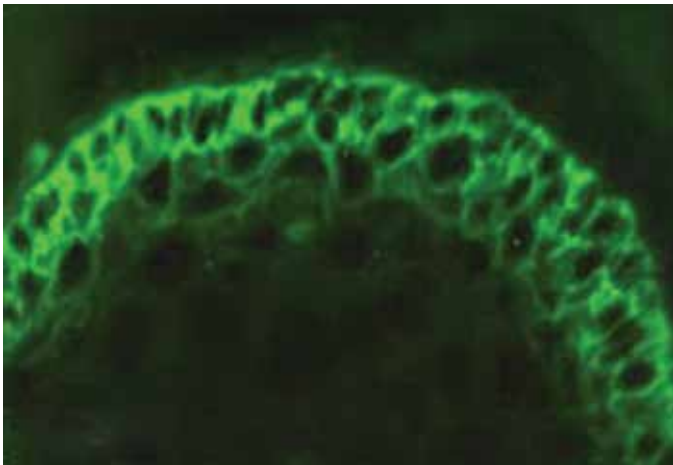
İİF'nin pozitif prediktif değeri aktif PV hastalarında %90'ları bulurken, akkiz epidermolizis büllöza (AEB), Lineer IgA dermatozu (LAD), IgA pemfigusunda %50'lerdedir. Genel olarak OBH'de negatif prediktif değeri de düşüktür (7).

Pemfigus

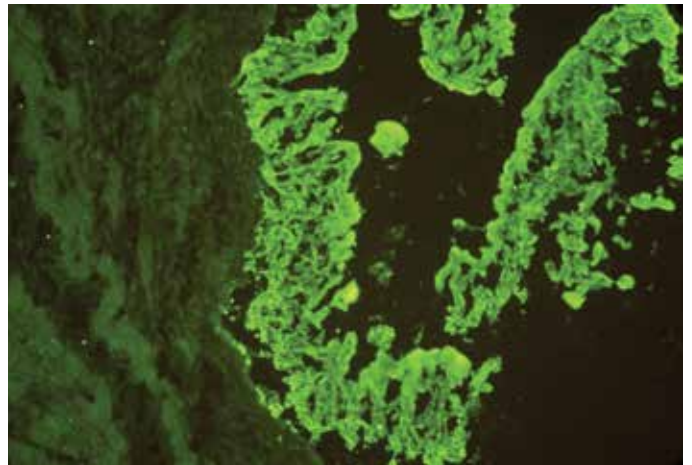
Pemfigus hastalarının serumunda IgG otoantikörleri İİF ile %80-90 olguda saptanmaktadır (11,12). PV, PF ve ilaca bağlı pemfigus hastalarında IgG interselüler aralıkta (İSA) depolanırken pemfigus eritematozus ve paraneoplastik pemfigusda (PNP) İSA ile birlikte bazal membran zonunda (BMZ) da depolanma gözlenir. Tüm pemfigus tiplerinde otoantikörler sadece çok katlı yassı epitelde depolanırken PNP'de ek olarak kolumnar ve transizyonel hücreli epitelde de depolanma gözlenir. PNP tanısında en iyi tarama testi plakin zengin sıçan mesanesi epiteli ile İİF'dir, sensitivitesi %75 ve spesifitesi %83 olarak bildirilmiştir (Şekil 3) (13). İSA'da IgA depolanması IgA pemfigusu için karakteristiktir ve hastaların yaklaşık %50'sinde saptanır (14). Dolaşımdaki IgA otoantikörlerini saptamada deri kültürünün, standart insan



Şekil 1. Eming ve Hertl tarafından önerilen tanısal yaklaşım (4)



Şekil 2. İndirekt immüno Floresanda sıçan özofagusu kesitinde interselüler aralık depolanması



Şekil 3. İndirekt immüno Floresanda sıçan mesanesi kesitinde interselüler aralık depolanması

derisi ve maymun özofagusu gibi substratlardan daha sensitif olabileceği bildirilmiştir (15).

Pemfigus benzeri antikolar yanık, penisiline bağlı ilaç erupsiyonu, deri grefti, BP ve mukozal pemfigoid ve toksik epidermal nekroliz hastalarında da bildirilmiştir. Bu hastalarda yalancı pozitiflik gözlenebilmektedir (7).

Pemfigoid

BP'de kanda dolaşan anti-BMZ IgG otoantikoları hastaların %60-90'ında İİF yöntemler ile saptanabilmektedir. Tercih edilen, en sensitif substrat TAİD'dir (16,17). Bir M NaCl içerisinde 48-72 saat 4 °C bekletilerek lamina lusina boyunca ayrıştırılmış normal insan derisinde lineer depolanma ayrışmanın epidermal (%80 olguda) veya hem epidermal hem de dermal (%20 olguda) tarafında saptanırsa bu öncelikle BP'yi işaret eder (11). BP'nin AEB, anti-laminin 332 pemfigoidi ve anti-p200 pemfigoidinden ayrılması için bu test yapılmalıdır. AEB, anti-laminin 332 pemfigoidi ve anti-p200 pemfigoidinde ayrışmanın dermal tarafında IgG depolanması görülür (Şekil 4) (Tablo 1) (18).

Pemfigoid gestasyonesde İİF pozitifliği %10-30 kadardır (7,19). İİF ile %25 olguda dolaşan anti-BMZ IgG antikoları saptanırken %50-75 olguda da komplemanı fikse eden anti-BMZ IgG antikoları (HG faktör) saptanır (7,11). HG faktör testi rutin İİF yöntemlerden daha zor uygulanabilir bir test ve DİF pozitif hastalarda düşük tanısallığa sahip olduğundan, pemfigoid gestasyones düşünülen ve tanısı histopatoloji ve DİF ile doğrulanamamış hastalarda uygulanabilir.

Sikatriyel pemfigoidde olguların %25'inde İİF pozitifliği bildirilmiştir (7).

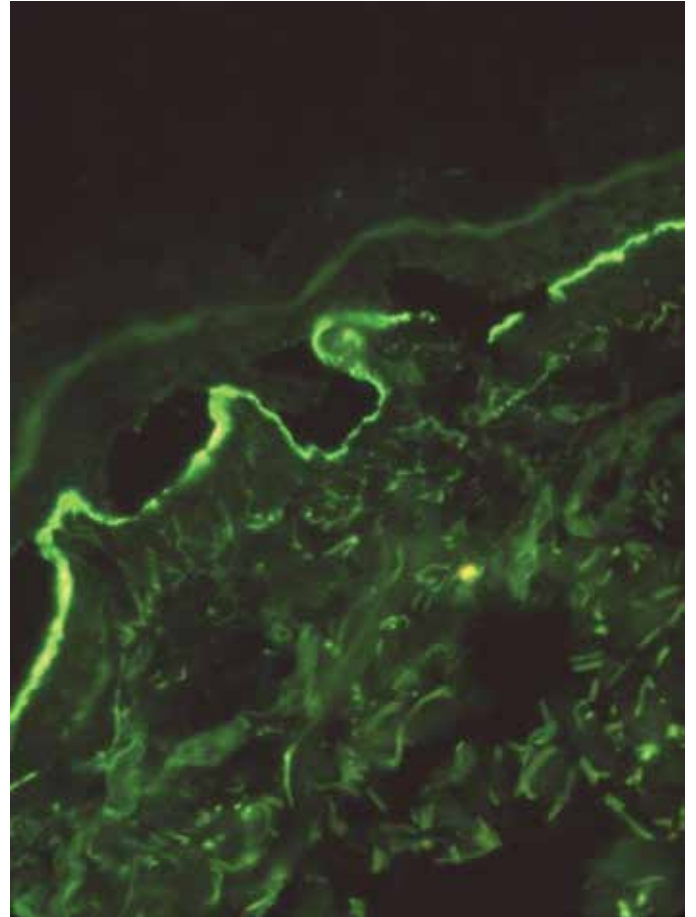
LAD'da; İİF ile anti-BMZ IgA antikoları erişkin olguların en fazla %30'unda saptanır, bu oran çocuklarda %80 olarak bildirilmiştir ve saptanması karakteristiktir (20). TAİD'de lineer depolanma sıklıkla ayrışmanın epidermal tarafında saptanır. Ancak ayrışmanın sadece dermal tarafında veya hem epidermal hem de dermal tarafında da depolanma görülebilir (Tablo 1).

Tablo 1. Tuzda ayrıştırılmış insan derisi ile subepidermal otoimmün bullöz hastalıklarının ayırımı

TAİD'de bazal membranda lineer C3, IgG, (IgA) depolanması	
Bullöz pemfigoid	Epidermal
Pemfigoid gestasyones	
Liken planus pemfigoides	
Müköz membran pemfigoidi	Dermal
Anti-laminin 332 (antiepiligrin)	Dermal
Anti-p200/Laminin γ 1 pemfigoid	Dermal
Tip 4 kollajen α 5 zinciri bullöz hastalığı	Dermal
Akkiz epidermolizis bulloza	Dermal
Bullöz SLE (IgA, IgG2, IgG3)	Epidermal, dermal veya mix
TAİD'de bazal membranda lineer IgA depolanması	
Lineer IgA dermatozu	Epidermal, dermal veya mix
SLE: Sistemik lupus eritematozusun, TAİD: Tuzda ayrıştırılmış insan derisi	

İndirekt İmmüno Floresan Mozaik Tabanlı Biyoçip

Son dönemlerde tanıda DİF ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'dan daha ucuz, pratik ve hızlı yapılabilir bir test elde etmek amacıyla İİF mozaik tabanlı biyoçip yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemle birden fazla antikor spesifik antijenik substrat kullanılarak OBH'de tanıya ulaşmak amaçlanmaktadır. Standart boyuttaki slaytta on inkübasyon alanı (her bir inkübasyon alanı 1 hastaya ait), her inkübasyon alanında substrat olarak farklı antijenik yapılar bulunmaktadır (Şekil 5) (21). Substratlar öncelikle ince bir cam üzerine yapıştırılarak standart boyutlarda kesilmekte ve biyoçipler elde edilmektedir. Bir inkübasyon alanında farklı biyoçipler bir araya getirilerek biyoçip mozaikleri oluşturulmaktadır. Standart İİF yöntemlerden farklı olarak bu yöntemde substrat olarak doku kesitlerinin (maymun özofagusu kesiti, 1 mol/L NaCl'de ayrıştırılmış insan derisi kesiti) yanında Dsg 1, Dsg 3 ve BP230 globüler C-terminal domaini vb. aktarılmış hücreler ve antijen alanları (rekombinant tetramerik BP180NC16A antijen spotları) da kullanılabilmektedir. Standart İİF yöntemde uygulanan prosedürler geçerlidir. OBH'nin tanısında tarama testi olarak kullanılabilecek bir yöntem olarak gelecek vaat etmektedir. Bir biyoçip üzerinde birden fazla antijenik yapının bulunması tek bir serum örneği ile OBH arasında ayırıcı tanı yapma olanağı sunmaktadır (Şekil 6, 7, 8). Yapılan çalışmalarda biyoçip yönteminin pemfigus ve BP tanısı koymada oldukça

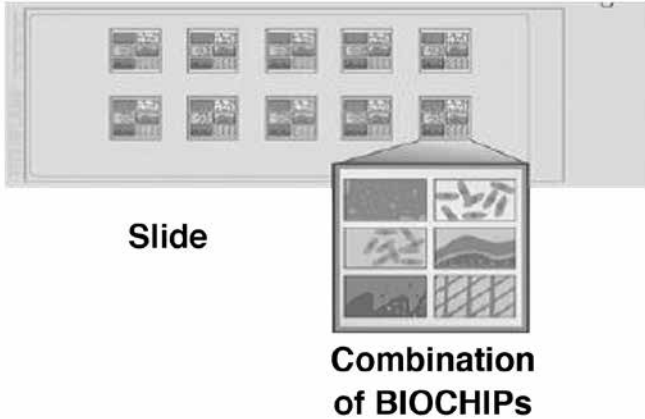


Şekil 4. İndirekt immüno floresanda tuzda ayrıştırılmış insan derisi kesitinde dermal lineer depolanma

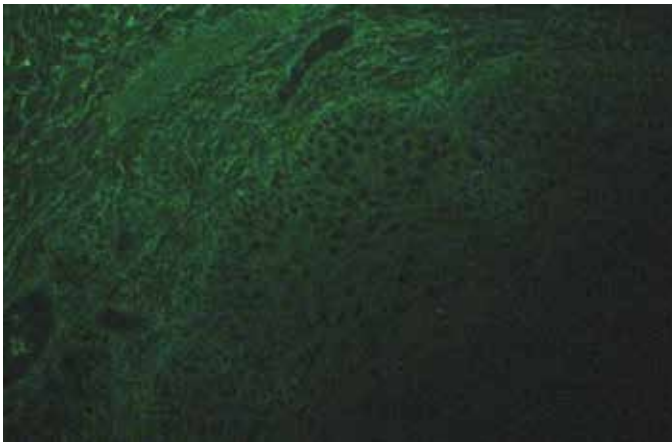
sensitif ve spesifik olduğu yönünde veriler mevcuttur. Bizim çalışmamızda da biyoçip yönteminin pemfigus tanısını koymada sensitivitesi ve spesifisitesi sırasıyla %91,1 ve %97,1 olarak, BP tanısı koymada sensitivitesi ve spesifisitesi sırasıyla %94,4 ve %94,3 olarak oldukça yüksek saptanmıştır (22). Çalışmaların çoğunda pemfigus tanısı koymada en sensitif substrat rekombinant tetramerik BP180NC16A antijen spotları olarak bildirilmektedir (23-27). Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bunun yanında çalışmamızda anti-Dsg 1, anti-Dsg 3, anti-BP180 otoantikörlerini saptamada ELISA ve biyoçip yöntemleri birbirleri ile uyumlu bulunmuştur (22).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ELISA, enzime bağlı immünosorbent test olarak ifade edilmektedir. Hasta örneklerinde (serum, tükürük, vb.) antijen (HBsAg) veya antikör (anti-Dsg) belirlenmesi için uygulanan bir testtir. Ticari olarak hazırlanmış setler kullanılabilir. İmmünoblotting ve immünopresipitasyon testlerde olduğu gibi kanda dolaşan otoantikörlerin spesifik olarak hangi antijenik yapılara karşı geliştiğini saptayan testlerden biridir. Büllü hastalıklar ile ilişkili olabilecek antijene spesifik

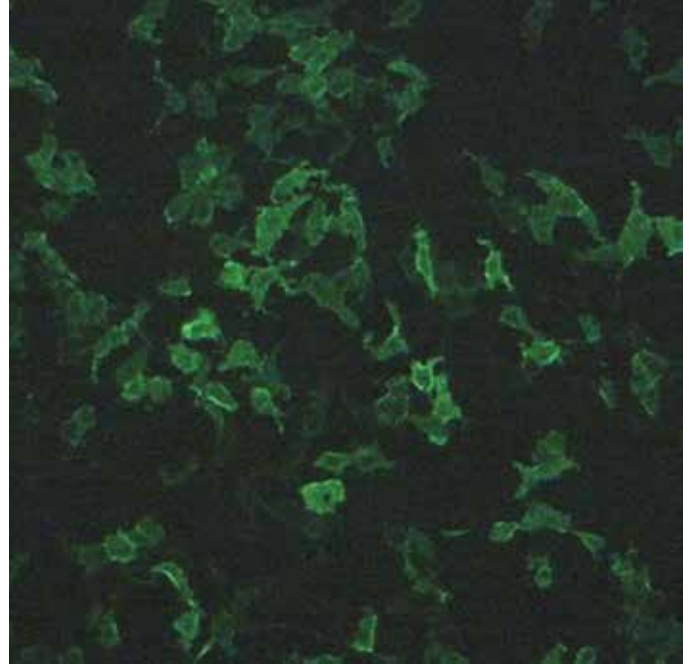


Şekil 5. Mozaik tabanlı indirekt immünofloresan biyoçip slaytı (21)

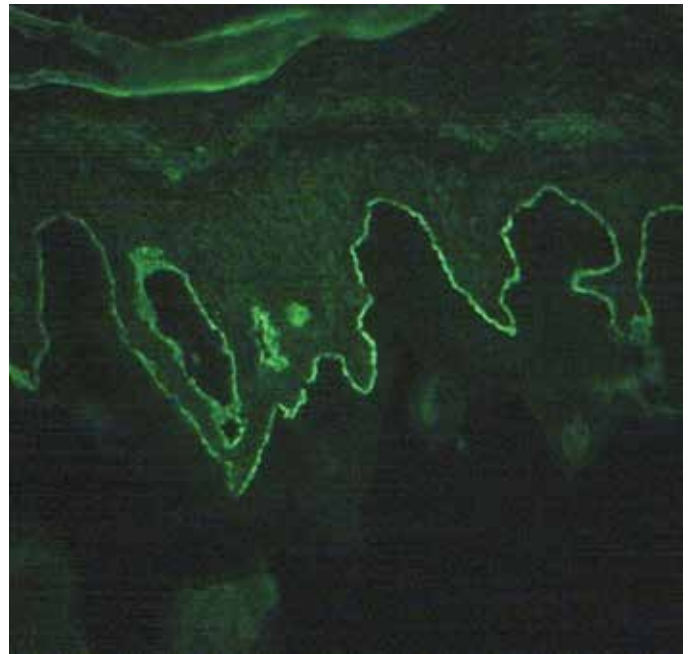


Şekil 6. İnterselüler aralık pozitifliği (EUROIMMUN_Mozaik 7_BİYOÇİP_maymun özofagusu, x600)

otoantikörlerin saptanması amacıyla yapılmaktadır. Klinik, histopatolojik ve immünofloresan yöntemlere ek olarak OBH'nin tanısında doğrulama testi olarak kullanılmaktadır. Günümüzde ELISA ticari test sistemlerinin (örneğin; Dsg 1, Dsg 3, BP180 NC 16A, envoplakin, epidermal transglutaminaz gibi) geliştirilmesi ile bu spesifik antikörlerin titrasyonu hastalığın tanısı, takip ve tedaviye alınan yanıtın değerlendirilmesinde araştırma amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (4,28-30).



Şekil 7. Anti-Dsg 3 pozitifliği (EUROIMMUN_Mozaik 7_BİYOÇİP_HEK290 hücreleri, x600)



Şekil 8. Epidermal lineer bazal membran zonu depolanması (EUROIMMUN_Mozaik 7_BİYOÇİP_TAİD, x600)

Diğer geleneksel tanı yöntemlerine göre ELISA daha hızlı, uygulanması kolay, daha iyi standardize edilebilir olması ve birçok örneğin aynı anda çalışılabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Ancak kullanıma hazır ELISA kitlerinin hastalıkla ilişkili tüm antijenik epitoplara ve aktivite ile ilişkili otoantikor alt tiplerini içermediği unutulmamalıdır. Ayrıca yalnızca pozitif sonuçların olabileceği de bilinmelidir (31). Laboratuvar testlerde otoantikor varlığının saptanması, hastanın o sırada var olan yakınımından sorumlu olmayabilir. Sonuçlar, klinik ve histopatolojik olarak ilişkilendirilerek yorumlanmalıdır.

Günümüzde ELISA, büyük ölçüde immünoblotting ve immünopresipitasyon testlerinin yerini almıştır. Son zamanlarda multivariant ELISA ile farklı antijenik yapıları bir testte çalışılması için tanı çalışmaları yürütülmektedir (32).

Özellikle pemfigus ve pemfigoid grubu hastalıklarda klinik aktivite ile ELISA sonuçları arasında pozitif bir korelasyon gösterilmiştir (33,34).

Pemfigus

PV tanısında ELISA'nın kanda dolaşan otoantikorları saptamada en sensitif ve spesifik test olduğu düşünülmektedir (35,36). Özellikle, Dsg 1 ve Dsg 3'ün antijenik ektodomainlerinin aktarıldığı insan HEK293 hücrelerinin kullanıldığı yeni ELISA testinin oldukça sensitif ve spesifik olduğu bildirilmiştir (29). Pemfigus tanısında farklı ticari ELISA sistemlerinde testin sensitivitesinin hem anti-Dsg 1 hem de anti-Dsg 3 için %90'ın üzerinde, spesifitesinin %95'lerde olduğu bildirilmiştir (33,37,38). Tampoia ve ark.'nın (35) derlediği metaanalizde de anti-Dsg 3'ün sensitivitesi %97 ve spesifitesi %98,5 bildirilmiştir. PV, Dsg 3'e ve nadiren Dsg 3 ile birlikte Dsg 1'e karşı oluşan otoantikorlar ile ilişkili iken PF tek başına Dsg 1'e karşı oluşan antikorlar ile ilişkilidir. Deri lezyonlarının şiddeti anti-Dsg 1 antikor düzeyi ve oral mukoza lezyonlarının şiddeti anti-Dsg 3 antikor düzeyi ile ilişkili bulunmuştur (39-41). Bunun yanında bizim yaptığımız çalışmada pemfigus hasta grubunda ELISA sonuçlarının prediktif değerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (41). Ancak PV hastalarında hastalığın takibinde deri lezyonlarının seyri ile ELISA anti-Dsg 1 antikor değerleri arasında yakın korelasyon mevcutken, mukozal lezyonların seyri ile ELISA anti-Dsg 3 otoantikor değerleri arasında paralellik gösterilemediğini bildiren yayınlar da mevcuttur (42). Mukozal lezyonların şiddeti ile tükürük ELISA anti-Dsg 1 otoantikor değerleri arasında anlamlı ilişki bildirilmiştir (40).

İİF titrasyonları ile Dsg 1 ve Dsg 3'e karşı spesifik otoantikorların ELISA değerleri karşılaştırıldığında; İİF titrelerinde artış olmasına karşın ELISA sonuçlarının belli bir değerden sonra aynı düzeyde kaldığı gözlenmiştir (43). Bu nedenle, takipte ve araştırma amacıyla ELISA kullanılacaksa gerçek indeks değeri için, sonuç >150 IU/ml ise dilüsyon yapılması önerilebilir (44).

PNP tanısında ise envoplakin rekombinant N-terminalini içeren ticari ELISA testi kullanılmaktadır; sensitivitesi %82, spesivitesi %100 olarak bildirilmiştir (45). Periplakinin rekombinant N-terminalini içeren ELISA testi de mevcuttur (46).

Yanık hastalarında, alerjik ilaç reaksiyonlarında (Steven johnson sendromu, toksik epidermal nekroliz), fungal enfeksiyonlarda ve ABO kan grubu antijenlerine karşı antikor

geliştiren hastalarda kanda dolaşan pemfigus otoantikorları düşük titrelerde saptanabilmektedir (47-49).

Pemfigoid

Bir çok çalışma BP tanısında ELISA'nın oldukça sensitif ve spesifik olduğunu desteklemektedir. Özellikle rekombinant proteinlerin kullanıldığı ELISA testleri BP tanısında bir dönüm noktasıdır. Piyasada bulunan EUROIMMUN (Lübek, Almanya) ve MBL (Nagoya, Japonya) ELISA testleri ile sırasıyla %80-90 ve %60-70 oranında kanda dolaşan BP180 NC16A ve BP230 C-terminal fragmandaki otoantijenlere karşı gelişen otoantikorlar saptanabilmektedir. Bu iki test kombine kullanıldığında tanıl sensitivite %90-100 olarak bildirilmiştir (8,50). BP230 rekombinant proteinlerin kullanıldığı ELISA, BP180'e göre daha az sensitif ve spesifiktir (51,52). BP180 NC16A domaini ve diğer BP180 epitoplarına karşı gelişen IgG otoantikorlarının serumdaki konsantrasyonu ile hastalık aktivitesi ve şiddeti ilişkili bulunmuştur (34,53,54). BP230 antijenine karşı gelişen otoantikorlar ile hastalık aktivitesi arasındaki ilişki ise çelişkilidir (53,55).

Polimorfik kaşıntılı deri hastalığı olan yaşlı bireylerde de BP180 ve BP230 antijenlerine karşı IgG otoantikorlarının önemli ölçüde yüksek oranlarda (%33 anti- BP180 ve/veya anti-BP230 pozitifliği) saptandığı akıld tutulmalıdır (56). Bu nedenle DİF ile dokudaki otoantikorlar gösterilmeden sadece ELISA ile BP tanısı konulmamalıdır.

Pemfigoid gestasyon hastalarının %90'ında BP180 16A'yı, %10'unda ise BP230 antijenini hedef alan otoantikorlar ELISA ile tespit edilmektedir (57).

Anti-p200 pemfigoidi tanısında kullanılmak üzere laminin gama 1'in rekombinant C terminali kullanılarak üretilen ELISA'nın sensitivitesi %70 ve spesifitesisi %98,7 olarak bildirilmiştir (58).

Akkiz Epidermolizis Büllöza

Tip 7 kollajenin NC1 domainine karşı oluşmuş otoantikorları saptayan duyarlı ELISA tetkiki mevcuttur (59).

Dermatitis Herpetiformis

Doku ve epidermal transglutaminaza karşı oluşmuş IgA'yı saptamak amacıyla geliştirilmiş sensitif (sırasıyla; %47-95, %52-100) ve spesifik (her ikisi de >%90) ticari ELISA sistemleri mevcuttur (60,61). Anti-DPG (sentetik gliadin derive peptid) antikorlarına ise (sensitivitesi; %55 IgA, %50 IgG) şüpheli durumlarda bakılması önerilmektedir. Son yıllarda dermatitis herpetiformis hastalarında anti-Gliadin (GAF-3X) (gliadin analog füzyon peptid) antikorları üzerinde çalışılmaktadır. Dermatitis herpetiformis hastalarında, Çölyak hastalığı ilişkili otoantikorları saptamada anti-Gliadin ELISA'nın sensitivitesi (%83 IgA, %78 IgG) oldukça yüksek bulunmuştur (62).

İmmünoblotting ve İmmünopresipitasyon

Her iki yöntem de hedef antijeni elektroforez ile ayrıştırılmış belirli moleküler ağırlıktaki protein bantları olarak saptar.

Pemfigus tanısında immünoblotting yöntem ile Dsg 3'e karşılık gelen 130-kDa bandı hedef alan hastanın serumundaki IgG tipi otoantikorlar gösterilmektedir. Deri tutulumu olan hastaların

serumunda Dsg 1'e karşılık gelen 160-kDa bandı hedef alan otoantikolar da bulunmaktadır. PNP tanısında en sensitif yöntem olduğu yönünde yayınlar mevcuttur (63), karakteristik olarak çift bant 210-kD ve 190-kD proteinler gözlenir (64).

BP tanısında immüno blottingin sensitivitesi değişkendir. Hastaların %75'inde BP230 antijeni ile reaksiyon oluşurken %50'sinde BP180 antijeni ile reaksiyon gözlenir. Hem IgG hem de IgA tipi otoantikolar saptanabilir (65). Son dönemlerde tanımlanan anti-p200 pemfigoidinde ise dermisteki 200-kD proteinleri tanıyan otoantikolar saptanır (18). AEB'de ise 290-kD tip 7 kollajen ve immüno dominant bölgesi olan non-kollajen domain 1 otoantikolar tarafından tanınır (66).

BP tanısında immüno presipitasyonda da BP230 ve BP180 antijenlerine karşı reaksiyon gözlenir (67).

Elektron Mikroskopisi

OBH'de elektron mikroskopisi (EM) için biyopsi perilezyonel alandan veya taze bir bülde alınmalıdır.

PV'de EM'de akantoliz keratinositler arası bağı kaybı olarak gözlenir, iki desmozom plağı ayrılır ve tenoflamentlerin oluşturduğu tek bağlantı plağı görülebilir (68).

BP'de bül oluşumu çapalayan fibriller ve hemidesmozomların kaybı ile bazal membranda lamina lusida seviyesinde gözlenmektedir (67).

İmmünoelektron Mikroskopisi

Altınla işaretleme yapılan bu yöntemin çözünürlüğü EM'ye göre dahayüksektir ve kantitatif analizler uygulanabilmektedir.

İmmün-EM ile PV ve PF'de otoantikoların epidermisteki desmozomlara, özellikle ekstraselüler kısmına bağlandığı gösterilmiştir. PV'de her bir desmozoma bağlanan altın partikülü sayısı epiderminin alt tabakalarında daha fazla iken PF'de epiderminin üst tabakalarında daha fazla bulunmuştur (68).

BP'de ise bu yöntem ile BP230 ve BP180'e karşı oluşan dolaşımdaki otoantikoların sırasıyla, hemidesmozomal plağa ve lamina lusida düzeyinde hemidesmozomların altına bağlandığı gözlenmiştir (69).

AEB'de ise sublamina densada işaretlenme gözlenir (70).

Son Söz;

- İİF, OBH'de tanıyı doğrulamak ve/veya büllöz hastalıklar arasında ayırıcı tanı yapmak amacıyla kullanılır.

- Biyoçip, tek bir serum örneği ile OBH arasında ayırıcı tanı yapma olanağı sunan bir İİF yöntemidir. OBH'nin tanısında tarama testi olarak kullanılabilir bir yöntem olarak gelecek vaat etmektedir. Pemfigus ve BP tanısı koymada oldukça sensitif ve spesifik olduğu yönünde veriler mevcut.

- Günümüzde ELISA ticari test sistemlerinin geliştirilmesi ile OBH'nin tanısı, takip ve tedaviye alınan yanıtın değerlendirilmesinde araştırma amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bunun yanında OBH'nin immüno patogenezi ve olası yeni tedavi yaklaşımlarını araştırmak amacıyla kullanılmaktadır.

- İmmüno blotting, immüno presipitasyon, EM ve İmmün-EM, OBH'nin rutin tanısında kullanılmayan, daha çok araştırma amaçlı tetkiklerdir.

Etik

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

Kaynaklar

1. Beutner E, Jordan R. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. Proc Soc Exp Biol Med 1964;117:505-10.
2. Beutner EH, Lever Wf, Witebsky E, et al. Autoantibodies in pemphigus vulgaris: response to an intercellular substance of epidermis. JAMA 1965;192:682-8.
3. Jordan RE, Beutner EH, Witebsky E, et al. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. JAMA 1967;200:751-6.
4. Eming R, Hertl M; Autoimmune Diagnostics Working Group. Autoimmune bullous disorders. Clin Chem Lab Med 2006;44:144-9.
5. Weiss D, Ristl R, Griss J, et al. Autoantibody levels and clinical disease severity in patients with pemphigus: Comparison of aggregated anti-desmoglein ELISA values and indirect immunofluorescence titres. Acta Derm Venereol 2015;95:559-64.
6. Akman A, Uzun S, Alpsoy E. Immunopathologic features of pemphigus in the east Mediterranean region of Turkey: A prospective study. Skinmed 2010;8:12-6.
7. Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. J Am Acad Dermatol 2001;45:803-22.
8. Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. Autoimmun Rev 2010;10:84-9.
9. Jiao D, Bystry J. Sensitivity of indirect immunofluorescence, substrate specificity, and immunoblotting in the diagnosis of pemphigus. J Am Acad Dermatol 1997;37:211-6.
10. Harman KE. New laboratory techniques for the assessment of acquired immunobullous disorders. Clin Exp Dermatol 2002;27:40-6.
11. Uzun S. Otoimmün büllöz hastalıkların tanısında immüno floresan bulgular. Türkderm 2011;45:31-35.
12. Sabolinski ML, Beutner EH, Krasny S, et al. Substrate specificity of anti-epithelial antibodies of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera in immunofluorescence tests on monkey and guinea pig esophagus sections. J Invest Dermatol 1987;88:545-9.
13. Helou J, Allbritton J, Anhalt GJ. Accuracy of indirect immunofluorescence testing in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. J Am Acad Dermatol 1995;32:441-7.
14. Wallach D. Intraepidermal IgA pustulosis. J Am Acad Dermatol 1992;27:993-1000.
15. Supapannachart N, Mutasim DF. The distribution of IgA pemphigus antigen in human skin and the role of IgA anti-cell surface antibodies in the induction of intraepidermal acantholysis. Arch Dermatol 1993;129:605-8.
16. Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO 3rd, et al. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. J Invest Dermatol 1984;82:139-44.
17. Zillikens D. Diagnosis of autoimmune bullous skin diseases. Clin Lab 2008;54:491-503.
18. Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, et al. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. J Invest Dermatol 1996;106:1333-8.
19. Jukic IL, Marinovic B. Significance of immunofluorescence in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses. Clin Dermatol 2011;29:389-97.
20. Wojnarowska F, Marsden RA, Bhogal B, et al. Chronic bullous disease of childhood, childhood cicatricial pemphigoid, and linear IgA disease of adults. A comparative study demonstrating clinical and immunopathologic overlap. J Am Acad Dermatol 1988;19:792-805.
21. Gosink J. Autoantibody diagnostics in skin-blistering diseases. Medlab Magazine 2013;4:16-8.
22. Özkesici B. İmmüno floresan mozaik tabanlı BİYOÇİP yönteminin pemfigus ve büllöz pemfigoid tanısında değeri. Uzmanlık Tezi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya, 2015.
23. Damoiseaux J, van Rijnsingen M, Warnemünde N, et al. Autoantibody detection in bullous pemphigoid: clinical evaluation of the EUROPLUS™ Dermatology Mosaic. J Immunol Methods 2012;382:76-80.
24. Zarian H, Saponeri A, Michelotto A, et al. Biochip technology for the serological diagnosis of bullous pemphigoid. ISRN Dermatol 2012;237802.

25. van Beek N, Rentzsch K, Probst C, et al. Serological diagnosis of autoimmune bullous skin diseases: Prospective comparison of the BIOCHIP mosaic-based indirect immunofluorescence technique with the conventional multi-step single test strategy. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:49.
26. Tampoia M, Zucano A, Villalta D, et al. Anti-skin specific autoantibodies detected by a new immunofluorescence multiplex biochip method in patients with autoimmune bullous diseases. *Dermatology* 2012;225:37-44.
27. Russo I, Saponeri A, Peserico A, et al. The use of biochip immunofluorescence microscopy for the diagnosis of Pemphigus vulgaris. *Acta Histochem* 2014;116:713-6.
28. Atzori L, Deidda S, Aste N. Enzyme-linked immunosorbent assay in autoimmune blistering diseases: Preliminary experience of the Dermatology Department of Cagliari. *G Ital Dermatol Venereol* 2008;143:1-8.
29. Schmidt E, Dahnrich C, Rosemann A, et al. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: Correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol* 2010;19:458-63.
30. Rose C, Armbruster FP, Ruppert J, et al. Autoantibodies against epidermal transglutaminase are a sensitive diagnostic marker in patients with dermatitis herpetiformis on a normal or gluten-free diet. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:39-43.
31. Wieland CN, Comfere NI, Gibson LE, et al. Anti-bullous pemphigoid 180 and 230 antibodies in a sample of unaffected subjects. *Arch Dermatol* 2010;146:21-5.
32. van Beek N, Dahnrich C, Hornig N, et al. Prospective controlled studies on the routine use of a novel multivalent ELISA for the diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Invest Dermatol* 2015;135:s32-s42
33. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, et al. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999;140:351-7.
34. Sitaru C, Dahnrich C, Probst C, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol* 2007;16:770-7.
35. Tampoia M, Giavarina D, Di Giorgio C, et al. Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to detect anti-skin autoantibodies in autoimmune blistering skin diseases: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2012;12:121-6.
36. Harman KE, Gratian MJ, Seed PT, et al. Diagnosis of pemphigus by ELISA: A critical evaluation of two ELISAs for the detection of antibodies to the major pemphigus antigens, desmoglein 1 and 3. *Clin Exp Dermatol* 2000;25:236-40.
37. Ng PP, Thng ST, Mohamed K, et al. Comparison of desmoglein ELISA and indirect immunofluorescence using two substrates (monkey oesophagus and normal human skin) in the diagnosis of pemphigus. *Australas J Dermatol* 2005;46:239-41.
38. Ishii K, Amagai M, Hall RP, et al. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997;159:2010-7.
39. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, et al. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 2001;144:775-80.
40. Hallaji Z, Mortazavi H, Lajevardi V, et al. Serum and salivary desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in pemphigus vulgaris: Correlation with phenotype and severity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:275-80.
41. Akman A, Uzun S, Alpsoy E. Immunopathologic features of pemphigus in the east Mediterranean region of Turkey: A prospective study. *Skinmed* 2010;8:12-6.
42. Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. *Arch Dermatol* 2009;145:529-35.
43. Bystryń JC, Akman A, Jiao D. Limitations in enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies against desmogleins 1 and 3 in patients with pemphigus. *Arch Dermatol* 2002;138:1252-3.
44. Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, et al. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. *Br J Dermatol* 2002;147:261-5.
45. Probst C, Schlumberger W, Stöcker W, et al. Development of ELISA for the specific determination of autoantibodies against envoplakin and periplakin in paraneoplastic pemphigus. *Clin Chim Acta* 2009;410:13-8.
46. Huang Y, Li J, Zhu X. Detection of anti-envoplakin and anti-periplakin autoantibodies by ELISA in patients with paraneoplastic pemphigus. *Arch Dermatol Res* 2009;301:703-9.
47. Park GT, Quan G, Lee JB. Sera from patients with toxic epidermal necrolysis contain autoantibodies to periplakin. *Br J Dermatol* 2006;155:337-43.
48. Cozzani E, Di Zenzo G, Calabresi V, et al. Anti-desmoplakin antibodies in erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome sera: pathogenic or epiphenomenon? *Eur J Dermatol* 2011;21:32-6.
49. Bystryń JC, Rudolph JL. Pemphigus. *Lancet* 2005;366:61-73.
50. Di Zenzo G, Della Torre R, Zambruno G, et al. Bullous pemphigoid: from the clinic to the bench. *Clin Dermatol* 2012;30:3-16.
51. Toma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, et al. BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2004;122:1413-22.
52. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2006;41:21-30.
53. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, et al. Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol* 2008;128:415-26.
54. Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, et al. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2000;136:174-8.
55. Kromminga A, Sitaru C, Hagel C, et al. Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. *Clin Immunol* 2004;111:146-52.
56. Feliciani C, Caldarola G, Kneisel A, et al. IgG autoantibody reactivity against bullous pemphigoid (BP) 180 and BP230 in elderly patients with pruritic dermatoses. *Br J Dermatol* 2009;161:306-12.
57. Sitaru C, Powell J, Messer G, et al. Immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of pemphigoid gestationis. *Obstet Gynecol* 2004;103:757-63.
58. Groth S, Recke A, Vafia K, et al. Development of a simple enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. *Br J Dermatol* 2011;164:76-82.
59. Chen M, Chan LS, Cai X, et al. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 1997;108:68-72.
60. Rose C, Armbruster FP, Ruppert J, et al. Autoantibodies against epidermal transglutaminase are a sensitive diagnostic marker in patients with dermatitis herpetiformis on a normal or gluten-free diet. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:39-43.
61. Antiga E, Caproni M. The diagnosis and treatment of dermatitis herpetiformis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2015;8:257-65
62. Kasperkiewicz M, Dahnrich C, Probst C, et al. Novel assay for detecting celiac disease-associated autoantibodies in dermatitis herpetiformis using deamidated gliadin-analogous fusion peptides. *J Am Acad Dermatol* 2012;66:583-8.
63. Poot AM, Diercks GF, Kramer D, et al. Laboratory diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol* 2013;169:1016-24.
64. Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, et al. Characterization of paraneoplastic pemphigus autoantigens by immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 1995;104:829-34.
65. Kiss M, Husz S, Molnár K, et al. Identification of different circulating autoantibodies in patients with bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by means of immunoblotting. *Acta Microbiol Immunol Hung* 1996;43:115-23.
66. Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, et al. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med* 1984;310:1007-13.
67. Patricio P, Ferreira C, Gomes MM, et al. Autoimmune bullous dermatoses: a review. *Ann NY Acad Sci* 2009;1173:203-10.
68. Ishiko A, Shimizu H. Electron microscopy in diagnosis of autoimmune bullous disorders. *Clin Dermatol* 2001;19:631-7.
69. Borradori L, Bernard P. Vesiculobullous Diseases, Pemphigoid Group. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 2nd ed. Spain: Mosby Elsevier; 2008.p.431-45.
70. Ishii N, Yoshida M, Hisamatsu Y, et al. Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: Study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. *Br J Dermatol* 2004;150:843-51.

Sorular

1. Aşağıdaki ifadelerden hangileri doğrudur?

- 1) ELISA kanda dolaşan otoantikörlerin spesifik olarak hangi antijenik yapılara karşı geliştiğini saptar.
- 2) Biyoçip yönteminde substurat olarak doku kesitleri kullanılabilir.
- 3) Biyoçip yönteminde substurat olarak Dsg 1, Dsg 3 ve BP230 globüler C-terminal domaini vb. aktarılmış hücreler kullanılabilir.
- 4) Biyoçip yönteminde substurat olarak antijen alanları (rekombinant tetramerik BP180NC16A antijen spotları) kullanılabilir.
- 5) Klasik indirekt immüno Floresan yöntemlerde substurat olarak sadece doku kesitleri kullanılabilir.

- a) 1,2
- b) 1,3,4,5
- c) 1,2,3,4,5
- d) 1,2,3,4
- e) 1,2,4

2. İndirekt immüno Floresan testler ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?

- a) Klasik indirekt immüno Floresan yöntemde Pemfigus vulgarisin IgG otoantikörlerini göstermede en sensitif substurat maymun özofagusudur.
- b) Klasik indirekt immüno Floresan yöntemde Pemfigus foliaceus tanısında tercih edilen substurat gine domuzu özofagusudur.
- c) Klasik indirekt immüno Floresan yöntemde PNP tanısında en iyi tarama testi plakın zengin siçan mesanesi epitelidir.
- d) Klasik indirekt immüno Floresan yöntemde İSA'da IgA depolanması IgA pemfigusu için karakteristiktir ve hastaların yaklaşık %90'ında saptanır.
- e) Büllöz pemfigoidin diğer subepidermal büllöz hastalıklardan ayrımında en sensitif substurat tuzda ayrıştırılmış insan derisidir.

3. ELISA ile ilgili aşağıdaki cümlelerden hangisi yanlıştır?

- a) BP230 rekombinant proteinlerin kullanıldığı ELISA, BP180'e göre daha sensitif ve spesifiktir.
- b) PNP tanısında envoplakin rekombinant N-terminalini içeren ticari ELISA testi kullanılmaktadır.
- c) Dsg1 ve Dsg3'ün antijenik ektodomainlerinin aktarıldığı insan HEK293 hücrelerinin kullanıldığı yeni ELISA testinin oldukça sensitif ve spesifik olduğu bildirilmiştir.
- d) Yanık hastalarında ve alerjik ilaç reaksiyonlarında pemfigus otoantikörleri düşük titrelerde saptanabilir.
- e) Pemfigoid gestasyonu hastalarının %90'ında BP180 16A antijenini hedef alan otoantikörler ELISA ile tespit edilmektedir.

4. Aşağıdaki otoimmün büllöz hastalık ELISA tetkikinde kullanılan otoantijen eşleştirmelerinden hangisi yanlıştır?

- a) Pemfigus vulgaris=İnsan HEK 293 hücrelerinden elde edilmiş Dsg 1 ve Dsg 3'ün ektodomain'i
- b) Büllöz pemfigoid=BP180 NC16A ve BP230'un C-terminal parçası
- c) Paraneoplastik pemfigus=Envoplakin'in N-terminal parçası
- d) Akkiz epidermolizis büllöz=Tip 4 kollajenin NC1 domainine
- e) Anti-p200 pemfigoid=Laminin gama 1'in rekombinant C terminali

5. İmmüno blotting yöntemde gözlenen çift bant 210-kD ve 190-kD proteinler aşağıdaki hastalıklardan hangisi için karakteristiktir?

- a) Pemfigus vulgaris
- b) Büllöz pemfigoid

- c) Akkiz epidermolizis büllöz
- d) Lineer IgA dermatozu
- e) Paraneoplastik pemfigus

6. Aşağıdaki tanı yöntemlerinden hangisinde kanda dolaşan otoantikörlerin spesifik olarak hangi antijenik yapılara karşı geliştiği saptanamaz?

- a) Klasik indirekt immüno Floresan
- b) Biyoçip
- c) ELISA
- d) İmmüno blotting
- e) İmmüno presipitasyon

7. Aşağıdaki otoimmün büllöz hastalık ve klasik indirekt immüno Floresan yöntemde immünreaktan birikim paterni eşleştirmelerinden hangisi doğrudur?

- a) Büllöz pemfigoid=tuzda ayrıştırılmış insan derisinde lineer epidermal veya hem epidermal hem de dermal depolanma
- b) Anti-laminin 332 pemfigoidi=tuzda ayrıştırılmış insan derisinde lineer dermal depolanma
- c) Anti-p200 pemfigoidi=tuzda ayrıştırılmış insan derisinde lineer dermal depolanma
- d) IgA pemfigusu=maymun özofagusunda interselüler aralıkta depolanma
- e) Hepsi

8. Otoimmün büllöz hastalıkların tanısında biyoçip yöntemini diğer serolojik tanı yöntemlerinden ayıran en önemli özellik aşağıdakilerden hangisidir?

- a) Kanda dolaşan otoantikörlerin spesifik olarak hangi antijenik yapılara karşı geliştiğini saptayabilmesi
- b) Tek bir serum örneği ile otoimmün büllöz hastalıklar arasında ayırıcı tanı yapma olanağı sunması
- c) BP180 NC16A otoantijeninin substrat olarak kullanılması
- d) Dsg 1 ve Dsg 3 aktarılan insan HEK293 hücrelerinin substrat olarak kullanılması
- e) Doku kesitlerinde depolanan immünreaktanın anatomik lokalizasyonunu göstermesi

9. Otoimmün büllöz hastalıkların tanısında kullanılan aşağıdaki yöntemlerden hangisinde Dsg 1, Dsg 3, BP180NC16A, BP230 ve Tip 7 kollajene karşı oluşan otoantikörlerin spesifik olarak hangi otoantijene karşı oluştuğu immüno Floresan mikroskopu yardımıyla değerlendirilebilir?

- a) ELISA
- b) Biyoçip
- c) Klasik indirekt immüno Floresan
- d) İmmüno blotting
- e) İmmüno presipitasyon

10. Bir M NaCl içerisinde 48-72 saat 4 °C bekletilen normal insan derisi hangi seviyeden ayrıştırılmış olur?

- a) Lamina lusida
- b) Lamina densa
- c) Sublamina densa
- d) Suprabazal
- e) Subkorneal